

THESIS

MARBURG

1966

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Über das Verhalten der Phosphopyridinnukleotide der Hefe bei Vermehrung und Vermehrungshemmung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Regina Dehner, geb. Rosenberger
aus Ranis

Marburg 1966

Kleinoffsetdruck: Görlich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Über das Verhalten der Phosphopyridinnukleotide der Hefe bei Vermehrung und Vermehrungshemmung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Regina Dehner, geb. Rosenberger

aus Ranis

Marburg 1966

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 12. 7. 1966

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. O. Braun-Falco

Referent: Prof. Dr. W. Schmid

Correferent: Doz. Dr. W. Kunz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Experimenteller Teil	
I. Methode	7
II. Versuche	
1.) Normales Wachstum und Vermehrung	11
2.) Hemmung der Vermehrung durch Erhöhung der Zelldichte	12
3.) Hemmung durch Weglassen der N-Quelle	14
4.) Hemmung durch Weglassen von Kochsaft	15
5.) Hemmung durch NaF	16
6.) Hemmung durch Narkotika	
a) Äthanol	18
b) Urethan	20
7.) Hemmung durch Phenol	22
Diskussion	24
Zusammenfassung	28
Tabellen	29
Literaturverzeichnis	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Die Nikotinaminadeninnukleotide, die synonym den Phosphopyridinnukleotiden sind, spielen im Zellstoffwechsel eine wichtige Rolle. Als Cofermente übertragen sie bei vielen Abbaureaktionen in der Gärungskette und im Tricarbonsäurecyclus den Wasserstoff und liefern ihn zum größten Teil zur Energiegewinnung an die Atmungskette an. Ein anderer, kleinerer Teil wird für die reduktiven Synthesen, z.B. Aminosäure- und Fettsäuresynthesen, verwendet.

Von den beiden Phosphopyridinnukleotiden wird das Diphosphopyridinnukleotid (NAD bzw. DPN) vorwiegend im dissimilatorischen Stoffwechsel benötigt, während das Triphosphopyridinnukleotid (NADP bzw. TPN) vorwiegend an den assimilatorischen Reaktionen beteiligt ist. Diese Teilung ist jedoch nur als grobes Schema aufzufassen, da NADP z.B. auch das Schlüsselcoferment des oxydativen Glukoseabbaues (Glukose-6-Phosphat) ist.

Die Konzentration der Pyridinnukleotide in der Zelle könnte in vielen Fällen limitierend sein. Wir stellten uns diese Frage für das Zellwachstum und die Zellvermehrung der Hefe. Als Testobjekt wurde die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) herangezogen. Über Neubildung von Phosphopyridinnukleotiden unter bestimmten Stoffwechselbedingungen wurde von einer Reihe von Autoren berichtet. H o f m a n n ^{1,2)} gibt eine Steigerung der DPN-Synthese in lebenden Zellen unter Nikotinsäureamid- und Nikotinsäureeinwirkung um 100 - 200% an.

Nachdem es in vorausgegangenen Arbeiten gelungen war, durch fraktioniertes Zentrifugieren weitgehend synchronisierte Hefezellen zu erhalten, bei denen sowohl das Zellwachstum als auch die Sprossung gut verfolgt werden konnte, erschien es uns aussichtsreich, das Verhalten der Pyridinnukleotide noch einmal zu untersuchen, und zwar synoptisch mit diesen beiden Vorgängen. Eine Überprüfung schien aus einem weiteren Grund notwendig. Er betrifft die Verbesserung der Extraktion der hydrierten

Pyridinnukleotide nach der Methode von K l i n g e n =
b e r g ³⁾.

Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit die Verhältnisse bei der unbeeinflussten Hefe untersucht. Daran schlossen sich die Versuche an, bei denen Veränderungen der Milieubedingungen vorgenommen wurden und Pharmaka, wie Glykolysehemmer, Narkotika und Phenol, einwirkten.

Methoden

1.) Vorbereitung der Ansätze

a) Gewinnung synchronisierter Zellen

Zu allen Versuchen wurden nur große, durch fraktionierte Zentrifugation gewonnene Zellen normaler Bäckerhefe benutzt (Synchronisation nach J a c o b i ⁴).

Vor Versuchsbeginn wurde die synchronisierte Hefe, um immer etwa die gleiche Hefemenge zu bekommen, mit 1500 g 5 Minuten lang in der Stock-Zentrifuge zentrifugiert. 2 g Hefe wurden in 100 ml Kochsaft-Salzlösung (Verdünnung 1 : 10) aufgeschwemmt. Kochsaft und Salzlösung wurden zur besseren Haltbarkeit eingefroren.

b) Herstellung des Kochsaftes und der Salzlösung

200 g Hefe und 300 g aqua dest. wurden 15 Minuten lang gekocht und danach mit 1.900 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kochsaft verwendet.

Salzlösung nach W i l l i a m s o n und S c o p e s ⁵):

Glukose	0,17	m =	34	g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,015	m =	1,98	g	
KCl	0,01	m =	0,74	g	
MgCl ₂	0,0025	m =	0,51	g	auf 1 l auffüllen
CaCl ₂	0,0024	m =	0,35	g	
Na ₂ HPO ₄	0,38	m =	27,2	g	
Citronensäure	0,12	m =	5,04	g	

2.) Versuchsanordnung

Die 2%ige Hefelösung ließen wir in einem Wasserbad von 30° C wachsen und beatmeten sie noch zusätzlich. Zu verschiedenen Zeitpunkten, meistens sofort, nach 60 Minuten und nach 120 Minuten wurden zweimal je 1 g Hefe (= 50 ml Hefelösung) entnommen

und sofort 5 Minuten lang mit 1.500 g zentrifugiert. Das 1 g Hefe diente für die DPN- und TPN-Bestimmung, das andere für die DPN-H- und TPN-H-Bestimmung. Zusätzlich wurden zu den oben angegebenen Zeitabständen noch je 0,1 ml Hefelösung für die Zellzählung mit dem Celloscope entnommen (s. A r n o l d ⁶⁾). Alle 15-30 Minuten wurde außerdem noch die Sprossung bestimmt, indem 100 Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die sprossenden Zellen in Prozent ausgedrückt wurden.

3.) Extraktion der Hefe

Die Bestimmung der Pyridinnukleotide erfolgte nach den von H o l z e r ⁷⁾ und K l i n g e n b e r g ³⁾ beschriebenen Verfahren. Modifiziert wurden dabei die Hefemengen, die Extraktion und die Neutralisation. Alle Arbeitsgänge zur Vorbereitung der Bestimmung wurden bei 0° C ausgeführt.

a) Extraktion der oxydierten Pyridinnukleotide

Zur Extraktion von DPN und TPN wurde 1 g Hefe (= Zentrifugat) mit 5 ml 3,3%iger Perchlorsäure aufgeschwemmt, eingefroren und nach langsamem Auftauen eine Stunde auf den Magnetrührer gestellt. Wir ließen den Extrakt ca. eine Stunde eingefroren. Mehrere Versuche mit unterschiedlichen Frierzeiten zeigt Tabelle 1. DPN- und TPN-Werte sind gleich, wenn die Extrakte sofort wieder aufgetaut werden oder bis zu vier Stunden eingefroren bleiben. Eine deutliche Vermehrung von DPN und TPN tritt nach 15 Stunden Frierzeit auf.

Die Extrakte wurden danach 20 Minuten in der Kühlzentrifuge mit 100.000 g zentrifugiert. 4,5 ml des Überstandes wurden in Spitzgläser pipettiert und mit 0,18 ml 5m K₂CO₃ neutralisiert. Nach etwa 20 Minuten war das Perchlorat ausgefallen.

b) Extraktion der reduzierten Pyridinnukleotide

Zur DPN-H und TPN-H-Bestimmung wurde die alkoholisch-alkalische Extraktion benutzt. Im Wasserbad wurden 3 ml 0,5m alkoholische KOH auf 70° C erhitzt, 1 g Hefe dazupipettiert und zwei Minuten im Wasserbad gelassen. Der Extrakt wurde sofort

abgekühlt und 30 Minuten bei 0°C auf den Magnetrührer gestellt. Anschließend wurde noch auf dem Magnetrührer mit 2 ml Triäthanolaminhydrochlorid-Phosphat-Puffer neutralisiert und mit der Kühlzentrifuge 20 Minuten mit 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gemessen. Nachextraktionen zeigten, daß bei beiden Extraktionsverfahren die Extraktion der Triphosphopyridinnukleotide vollständig war, Diphosphopyridinnukleotide fanden sich in geringen Mengen noch bei der Nachextraktion (Tabelle 2).

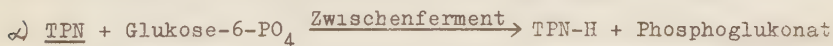
Tabelle 3 zeigt Pyridinnukleotidwerte aus sechs Extraktionen, die alle aus der gleichen Hefe gemacht wurden. Dabei fällt die besonders große Streuung von DPN-H auf.

4.) Enzymatische Bestimmung der Pyridinnukleotide

Die Bestimmungen wurden im Zeiß-Spektrophotometer PQM II bei 340 μ in Küvetten von 2 cm Schichtdicke durchgeführt. Bei zu großen DPN- und DPN-H-Konzentrationen wurden die Extrakte mit aqua dest. verdünnt.

a) DPN- und TPN-Bestimmung

Die Bestimmung von DPN und TPN wurde mit Hilfe folgender Fermentreaktionen durchgeführt.



Nacheinander wurde in die Küvette pipettiert:

2 ml Extrakt

0,7 ml Triäthanolaminhydrochlorid-Puffer (0,4m, pH 7,6)

0,01ml MgCl_2

0,1 ml 0,05m Glukose-6- PO_4 , mischen und auf 0 einstellen

0,02ml Glukose-6- PO_4 -Dehydrogenase "Boehringer", nach 10 Minuten Extinktionszunahme ablesen.

Berechnung:

$$0,1 \text{ E} = 24 \text{ } \mu \text{ TPN}$$

$$\text{E} \cdot 24 \cdot 2,34 \cdot 10 = \text{ } \mu \text{ TPN/1g Hefe}$$

$$\text{E} \cdot 562 = \text{ } \mu \text{ TPN/1g Hefe}$$

β) DPN + Alkohol Alkoholdehydrogenase → DPN-H + Acetaldehyd

Zum Inhalt der letzten Küvette noch

0,3 ml Semicarbacidalkohol, mischen, einstellen auf 0

0,05 ml Alkoholdehydrogenase "Boehringer" 1 : 10 verdünnt,
nach 10 Minuten Extinktionszunahme ablesen.

Berechnung:

$$0,1 \text{ E} = 21 \text{ } \gamma \text{ DPN}$$

$$\text{E} \cdot 21 \cdot 2,34 \cdot 10 = \gamma \text{ DPN/1g Hefe}$$

$$\text{E} \cdot 491 = \gamma \text{ DPN/1g Hefe}$$

b) Bestimmung von DPN-H und TPN-H

Zur Bestimmung von DPN-H und TPN-H wurden folgende Fermentreaktionen benutzt.

α) DPN-H + Pyruvat Lactatdehydrogenase → Lactat + DPN

β) TPN-H + α-Ketoglutar säure Glutamatdehydrogenase →
Glutaminsäure + TPN

DPN-H-Bestimmung:

2 ml Extrakt

0,7 ml Triäthanolaminhydrochlorid-Puffer

0,1 ml Brenztraubensäure (0,1%ig) einstellen auf 0,5

0,2 ml Lactatdehydrogenase "Boehringer", 1 : 10 verdünnt,
Extinktionsabnahme wird nach 3 Minuten abgelesen.

Berechnung:

$$0,1 \text{ E} = 16 \text{ } \gamma \text{ DPN-H}$$

$$\text{E} \cdot 16 \cdot 2,5 \cdot 10 = \gamma \text{ DPN-H/1g Hefe}$$

$$\text{E} \cdot 400 = \gamma \text{ DPN-H/1g Hefe}$$

TPN-H-Bestimmung:

In die gleiche Küvette

0,1 ml α-Ketoglutar säure (1m), wiedereinstellen auf 0,5

0,05 ml Glutamatdehydrogenase "Boehringer", 1:4 verdünnt,
nach 3 Minuten wird Extinktionsabnahme abgelesen.

Berechnung:

$$0,1 \text{ E} = 30 \text{ } \gamma \text{ TPN-H}$$

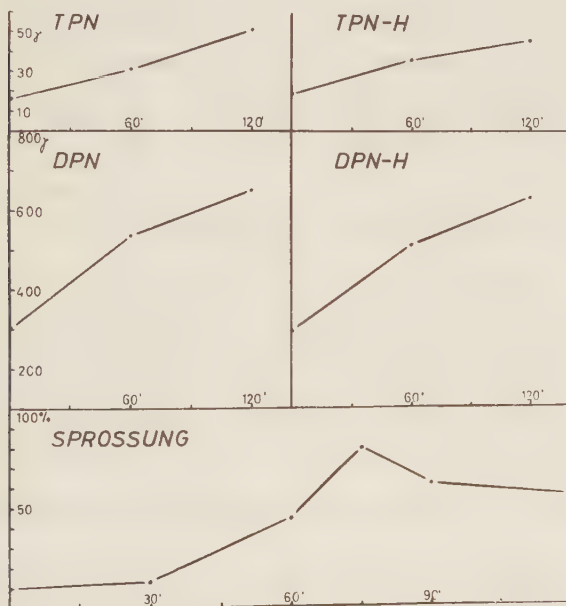
$$\text{E} \cdot 30 \cdot 2,5 \cdot 10 = \gamma \text{ TPN-H/1g Hefe}$$

$$\text{E} \cdot 705 = \gamma \text{ TPN-H/1g Hefe}$$

Versuche

1.) Normales Wachstum und Vermehrung

Die großen Hefezellen zeigen in einem zweistündigen unbeeinflussten Versuch folgendes Verhalten (s. Abb. 1, die Mittelwerte aus 13 Versuchen bringt).



Die mit dem Celloscope gemessene Gesamtzellzahl einer 2%igen Hefesuspension lag bei Beginn bei ca. $130.000/\text{mm}^3$ und blieb auch während des zweistündigen Wachstumsversuches etwa konstant (Tabelle 4). Die Zellvergrößerung, die aus den mit dem Celloscope erhaltenen Werten hervorgeht, ist nach 60 Minuten sicher zu einem Teil durch die sprossenden Zellen bedingt. Jedenfalls wird dadurch das reine Wachstum überdeckt. Die Sprossung be=

ginnt schon nach 30 Minuten und hat ihr Maximum von 80% nach 75 Minuten erreicht. Danach nimmt sie allmählich wieder ab.

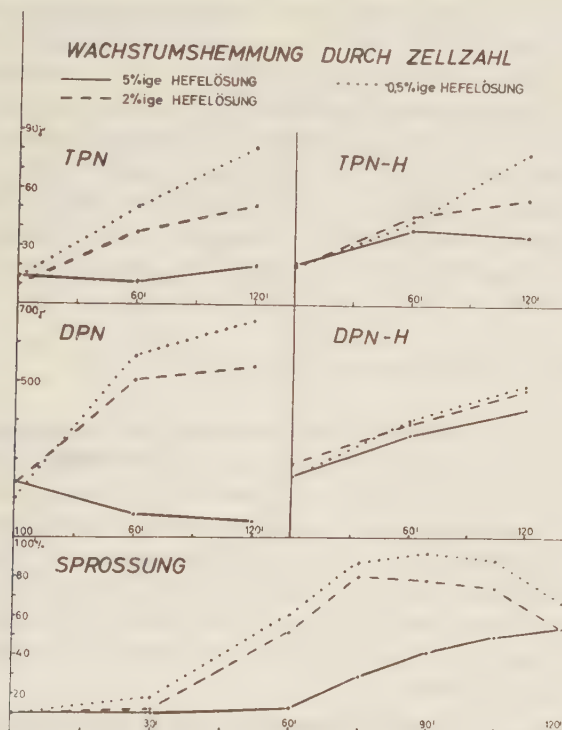
In der ersten Stunde findet bei allen Pyridinnukleotiden eine erhebliche Neubildung statt. Ihre Konzentration steigt ziemlich gleichmäßig auf etwa das Doppelte des Ausgangswertes an. In der zweiten Stunde ergeben sich zwischen den Diphosphopyridinnukleotiden und den Triphosphopyridinnukleotiden deutliche Unterschiede. Bei DPN ist die Zuwachsrate in diesem Zeitraum wesentlich geringer als in der ersten Stunde. Sie beträgt nur noch etwa 20 - 30%. TPN erhöht sich auch in der zweiten Stunde gleich stark wie in der ersten. Der Quotient $DPN/DPN-H$ lag schon beim sog. Sofortwert, der 5 - 10 Minuten nach Glukosezusatz abgenommen wurde, bei etwa 1 und veränderte sich während des Versuchsverlaufes nicht. Auch der Quotient $TPN/TPN-H$ lag zu Beginn bei 0,9. Eine leichte Verschiebung deutet sich nach zwei Stunden an (Tabelle 5).

Es fällt auf, daß das σ^m in den in der Tabelle 5 aufgeführten Werten ziemlich groß ist. Dies ist dadurch zu erklären, daß die von uns verwendete Hefe sicher nicht gleichmäßig lange gelagert war, ein Punkt, auf den wir keinen Einfluß haben. Wir beobachteten aber keinen einzigen Fall, in dem nicht eine erhebliche Synthese aller Pyridinnukleotide vorhanden war.

2.) Hemmung der Vermehrung durch Erhöhung der Zelldichte

Wie aus vorausgehenden Untersuchungen bekannt ist, zeigen Hefezellen in Abhängigkeit von der Zellkonzentration eine verschiedenen große Vermehrungsrate (S c h m i d ⁸). Je geringer die Einsaat ist, desto stärker ist diese. Wir untersuchten eine 0,5%ige, 2%ige und 5%ige Hefesuspension. Bei der 0,5%igen Aufschwemmung war nach lebhafter Sprossung die Zellzahl innerhalb von zwei Stunden um 70% angestiegen. Bei der 2%igen Lösung fand bei ungefähr gleich starker Sprossung keine Zellvermehrung innerhalb von zwei Stunden statt. Bei der 5%igen Aufschwemmung war der Sprossungsbeginn etwa 30 Minuten verzögert

und stieg langsam und auf wesentlich geringere Werte als bei den vorherigen Konzentrationen an (s. nachfolgende Abbildung).



Auch die Pyridinnukleotide zeigten ein deutlich differentes Verhalten. Bei der 0,5%igen Suspension war bei allen vier Pyridinnukleotidarten innerhalb von zwei Stunden ein stetiger Anstieg vorhanden. Das TPN erreicht nach zwei Stunden sehr hohe Werte, wie sie sonst bei keinem Versuch mehr beobachtet wurden. Bei der 2%igen Suspension wurde die Synthese vor allem bei den Triphosphopyridinnukleotiden in der zweiten Stunde deutlich verlangsamt, so daß nach zwei Stunden die gefundenen

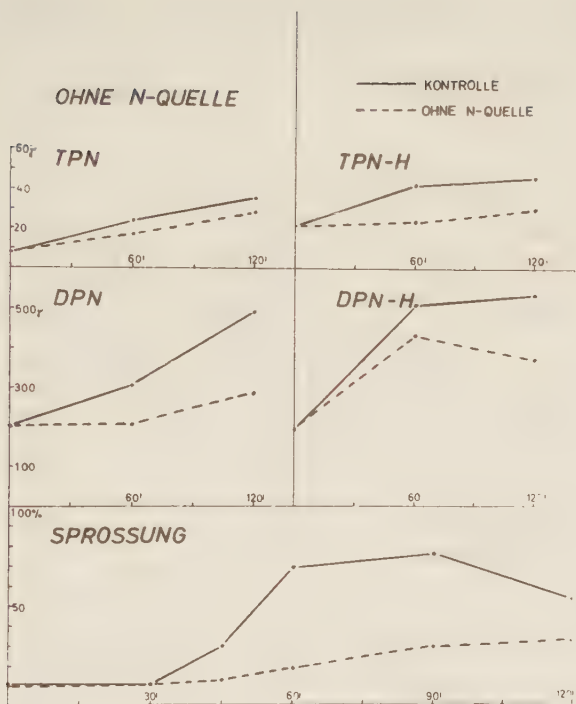
Werte 40 - 50% unter denen bei 0,5% lagen. Bei der 5%igen Suspension ergaben sich besonders deutliche Unterschiede zwischen reduzierten und nicht reduzierten Pyridinnukleotiden. Die oxydierten Pyridinnukleotide veränderten sich während der Beobachtungszeit nicht oder fielen wie bei DPN sogar ab. Bei DPN-H trat während der ersten Stunde etwa eine Verdoppelung ein, aber in der zweiten Stunde sistierte auch hier die Synthese. Am wenigsten von den dünneren Zellsuspensionen weicht DPN-H ab. Bei der 5%igen Zellsuspension ergibt sich in der ersten und zweiten Stunde eine Abnahme der Quotienten DPN/DPN-H und TPN/TPN-H. Diese ist darauf zurückzuführen, daß mit zunehmender Zellkonzentration die Atmung ab- und die Gärung zunimmt (S c h m i d ⁸).

3.) Hemmung durch Weglassen der N-Quelle

Um zu prüfen, ob zwischen Neubildung von Pyridinnukleotiden und Sprossung, d.h. Zellvermehrung, eine Beziehung besteht, wurde ein Versuch angesetzt, in dem durch Weglassen der N-Quelle ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) die Zellvermehrung stark gehemmt war. Trotz des Gehaltes an 10% Kochsaft trat im N-freien Ansatz nur eine geringfügige Sprossungstätigkeit ein, während sie bei der Kontrolle in dieser Zeit das Maximum schon erreicht hat. In der zweiten Versuchsstunde war auch beim N-freien Ansatz eine Sprossung von 30% in Gang gekommen.

Aus den Celloscopewerten geht hervor, daß die Hefe bei N-Freiheit nur geringfügig gewachsen war.

Bei diesen Versuchen war die Neubildung beider Triphosphopyridinnukleotide deutlich gehemmt. Bei den Diphosphopyridinnukleotiden war vor allem in den ersten 60 Minuten eine Neubildung von DPN-H, aber nicht von DPN vorhanden. Die Befunde, vor allem beim DPN, entsprechen denen von H o l z e r ^{9,10}, der ebenfalls beim Vorhandensein einer N-Quelle eine Synthese von Nukleotiden und Nukleinsäuren fand. Zu obigem s. nachfolgende Abbildung.



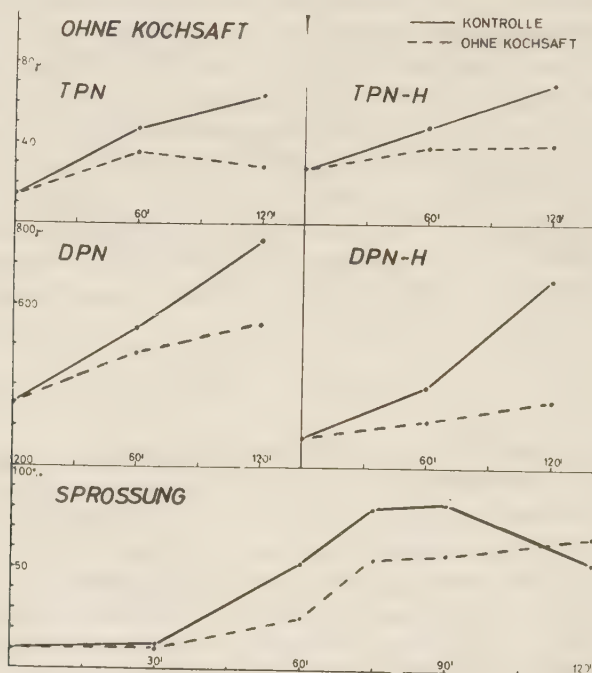
4.) Hemmung durch Weglassen von Kochsaft

Auch bei den Versuchen ohne Kochsaft blieb die Sprossung gegenüber der Kontrolle deutlich zurück. Sie betrug nach 60 Minuten die Hälfte des Kontrollwertes und hatte ihr Maximum von nur 66% erst nach 120 Minuten erreicht.

Im kochsaftfreien Ansatz war auch die Zellvergrößerung gegenüber der Kontrolle deutlich zurückgeblieben.

Die Bildung der Triphosphopyridinnukleotide war auch hier wieder gehemmt. Während der Kontrollwert von TPN-H um das 2,5-fache

nach zwei Stunden anstieg, vermehrte sich der kochsaftfreie Ansatz nur um das 1,4-fache. TPN hat sich in der ersten Ver=

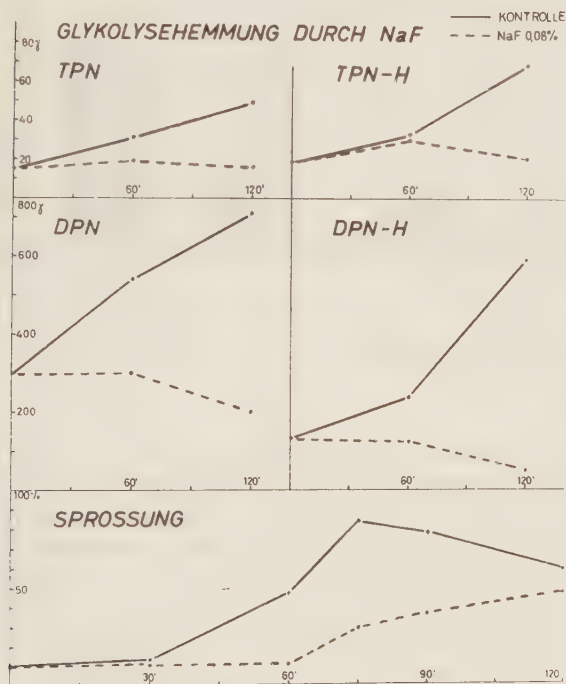


suchsstunde mehr als verdoppelt, fiel aber in der zweiten Stunde wieder ab und lag 45% tiefer als der Kontrollwert. Bei den Diphosphopyridinnukleotiden war vor allem eine Neubildung von DPN vorhanden, während die DPN-H-Bildung zurückgeblieben war.

5.) Hemmung durch NaF

Natrium-Fluorid greift in die Glykolyse ein, indem es den Abbau von Phosphoglycerinsäure in Phosphobrenztraubensäure blockiert (Leuthardt¹¹⁾).

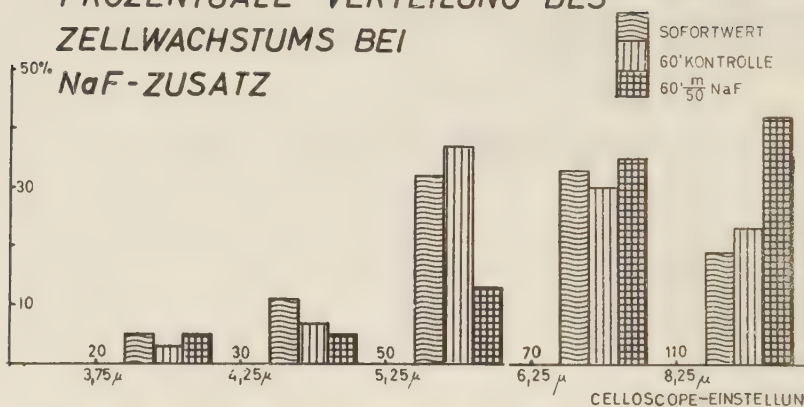
Natrium-Fluorid wurde den Testansätzen in einer Konzentration von $\frac{m}{50}$ zugesetzt. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, setzt die Sprossung erst nach 60 Minuten ein und erreicht nach 120 Minuten nur 47%. (Tabelle 6)



Eine Neubildung von Pyridinnukleotiden findet nicht statt. TPN und TPN-H bleiben konstant, während DPN und DPN-H in der zweiten Versuchsstunde abfallen. Auch bei NaF ist die Redoxlage der Pyridinnukleotide nicht verändert.

Die Celloscopewerte zeigen nach der ersten Versuchsstunde beim NaF-Ansatz ein reines Zellwachstum und nach der zweiten Stunde eine Vermehrung der Gesamtzellzahl um 22% gegenüber 7% bei der Kontrolle (s. nachfolgende Abbildung).

PROZENTUALE VERTEILUNG DES ZELLWACHSTUMS BEI *NaF*-ZUSATZ

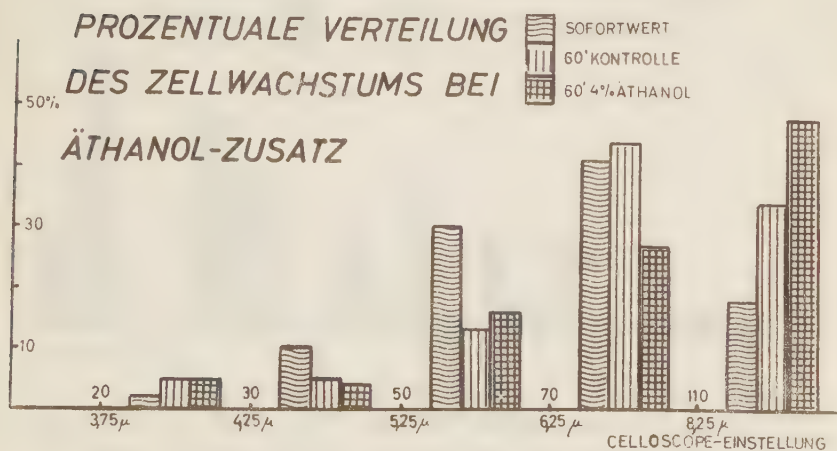
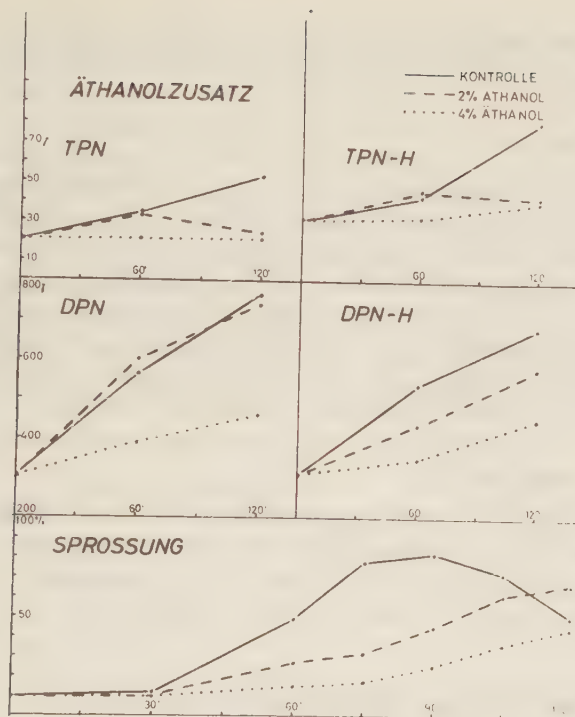


6.) Hemmung durch Narkotika

a) Äthanol

Bekanntlich stellt das Gärungsprodukt der Hefe, der Äthylalkohol, nach Erreichen einer bestimmten Konzentration die Zellvermehrung still. Dabei braucht die Gärung noch nicht zu sistieren, häufig ist sie aber gehemmt. Die voll vermehrungshemmende Konzentration beträgt nach früheren Untersuchungen 10 Vol.% Äthanol (Schmid⁸⁾). Bei weiterer Steigerung werden die Bäckerhefezellen abgetötet. Die von uns verwendeten Konzentrationen von 2 und 4% lassen eine deutliche Verzögerung der Sprossung erkennen. Ein Zellwachstum ist aber bei 4% nach 60 Minuten deutlich nachweisbar.

Bei den Diphosphopyridinnukleotiden war 2% Äthanol noch schwach wirksam, nur bei DPN-H ergab sich eine etwa 25%ige Hemmung der Neubildung. Bei 4% waren beide Anteile zwar angestiegen, aber stark gehemmt. Stärkere Abweichungen ergaben sich bei den Triphosphopyridinnukleotiden. Hier war bei 2%iger Äthanolkonzentration die Synthese zunächst nicht gehemmt, blieb aber dann stehen. Ein vollkommener Synthesestop tritt bei beiden Anteilen in einer 4%igen Konzentration ein. Eine Veränderung des



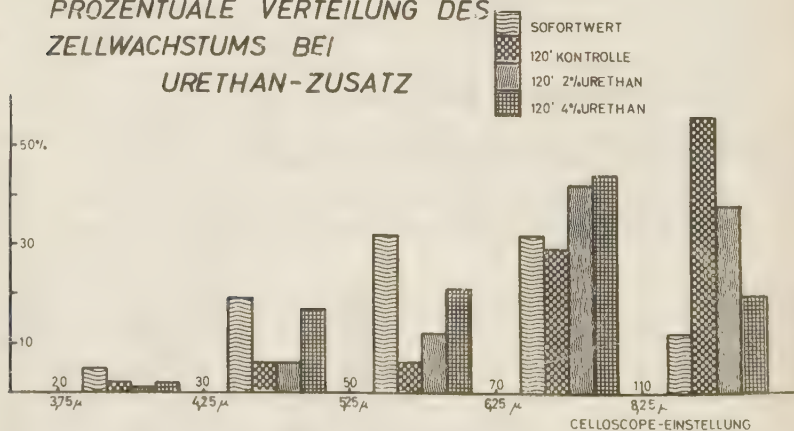
Redoxstatus der Pyridinnukleotide trat bei den geprüften Konzentrationen nicht ein. (Tabelle 7)

b) Urethan

Wie die Alkoholwirkung ist auch die von Urethan als narkotischer Effekt aufzufassen. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, besteht in der Beeinflussung des Stoffwechsels zwischen den beiden Substanzen aber ein deutlicher Unterschied. Während bei Alkohol Atmung und Gärung gleichmäßig und gleich stark gehemmt werden, gibt es bei Urethan Konzentrationen, welche die Atmung hemmen, die Gärung aber steigern. Sie liegen bei etwa 2%. Höhere Urethankonzentrationen hemmen sowohl die Gärung als auch die Atmung. Die zellschädigende Konzentration liegt bei etwa 6 - 8%.

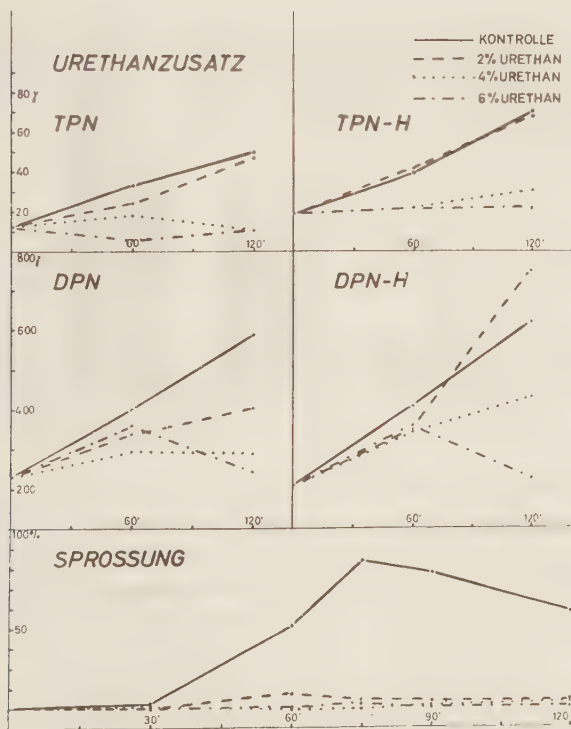
Alle von uns geprüften Konzentrationen (2, 4 und 6%) hemmten die Sprossung während der zweistündigen Beobachtungszeit völlig. Dagegen war bei 2 und 4% ein deutliches Zellwachstum vorhanden. Bei 6% fehlte auch die Zellvergrößerung (s. dazu folgende Abbildung).

PROZENTUALE VERTEILUNG DES
ZELLWACHSTUMS BEI
URETHAN-ZUSATZ



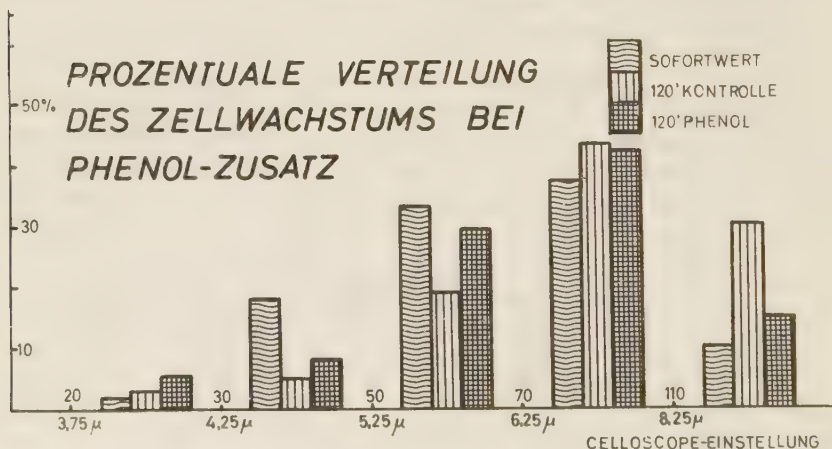
Bei den Diphosphopyridinnukleotiden ergab sich bei allen Konzentrationen während der ersten 60 Minuten, besonders beim

oxydierten Anteil, eine 30 - 40%ige Hemmung der Neubildung. Nach der nächsten Stunde war bei 2% noch ein geringer Anstieg, bei 4% ein Stillstand und bei 6% ein Abfall zu erkennen. Auch die DPN-H-Bildung war nach 60 Minuten in allen Konzentrationen geringfügig gehemmt. Bei zwei Stunden lag der 2%-Wert über der Kontrolle. Bei 4 und 6% war eine starke Hemmung zu erkennen. Bei den Triphosphopyridinnukleotiden war ein 2%iger Urethan-zusatz ohne deutliche Wirkung. Bei 4 und 6% fand keine Neubildung statt. Der Quotient TPN/TPN-H war bei der 2%igen Urethan-konzentration nach zwei Stunden deutlich erniedrigt, wahrscheinlich in Zusammenhang mit der oben beschriebenen verstärkten Gärung (siehe dazu nachstehende Abbildung und Tabelle 8).



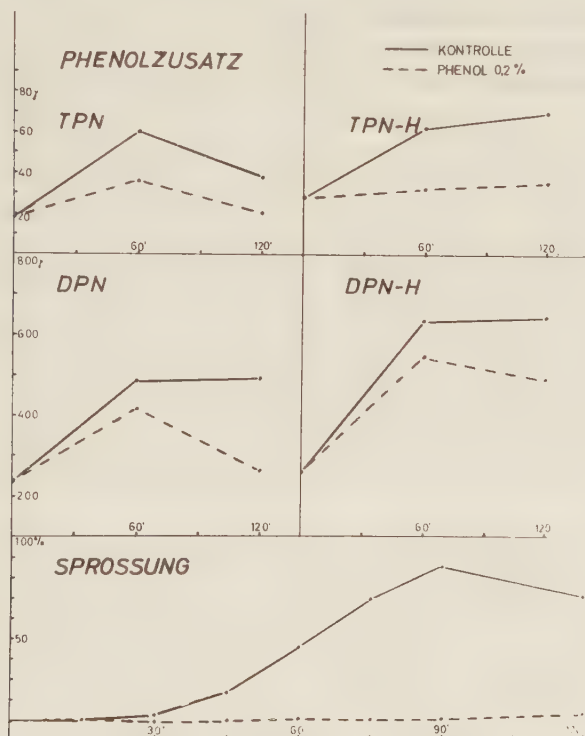
7.) Hemmung durch Phenol

Für unsere Versuche verwendeten wir eine 0,2%ige wäßrige Phenollösung. Nach früheren Versuchen liegt sie in einem Konzentrationsbereich, in dem die Vermehrung stillgelegt, die Zellen aber noch nicht abgetötet sind. Auch in den hier beschriebenen Versuchen unterblieb die Sprossung während zwei Stunden völlig. Dagegen war nach einer Stunde, spätestens nach zwei Stunden, eine geringfügige Zellvergrößerung vorhanden. Dieser Befund spricht dafür, daß die Zellen lebendig waren, da ebenfalls aus vorhergehenden Versuchen bekannt ist, daß abgetötete Zellen kleiner werden (s. nachfolgende Abbildung).



Die Pyridinnukleotide verhielten sich ganz ähnlich wie bei der 6%igen Urethankonzentration. Bei den Diphosphopyridinnukleotiden war nach 60 Minuten eine Neusynthese sowohl beim reduzierten als auch beim oxydierten Anteil vorhanden, die sogar nur wenig unter der Kontrolle war. Nach zwei Stunden war beim DPN-H keine Neubildung mehr vorhanden, beim DPN gingen die Werte sogar in den Bereich der Ausgangswerte zurück. Bei den Triphosphopyridinnukleotiden war nur beim oxydierten Anteil und nur in den ersten 60 Minuten eine geringfügige Neusynthese

vorhanden. Nach zwei Stunden kamen bei beiden Anteilen die Zahlen wieder in den Bereich der Ausgangswerte (siehe nachfolgende Abbildung und Tabelle 9).



Diskussion

Nach dem in der Dissertation von J a c o b i ⁴⁾ beschriebenen Verfahren gelang es verhältnismäßig leicht, durch fraktioniertes Zentrifugieren aus käuflicher Bäckerhefe eine Zellpopulation einheitlicher Größe zu gewinnen. An dieser wurde außer der Sprossung das Verhalten der hydrierten und oxydierten Phosphopyridinnukleotide untersucht. Außerdem wurde mit Hilfe des Celloscopes festgestellt, ob reines Zellwachstum vorhanden war. Ein solches lag vor, wenn bei gleichbleibender Sprossung das mit Hilfe dieses Gerätes ermittelte Zellvolumen anstieg. Bei zunehmender Sprossung kann allerdings über Zellwachstum nichts mehr ausgesagt werden, da das Gerät das durch die Capillaröffnung passierende Objekt lediglich nach seinem Gesamtvolumen mißt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen mit einer optimal zusammengesetzten Nährlösung trat zunächst in den ersten 30 Minuten Zellwachstum ein, dann setzte die Sprossung ein, und innerhalb von 45 Minuten trugen 75% aller Zellen Sprossen.

Bei den Diphosphopyridinnukleotiden lagen die Ausgangswerte sowohl für die oxydierte als auch für die hydrierte Stufe im Durchschnitt bei 300 μ /g ("synchronisierte" Frischhefe). Diese Werte zeigen relativ große Schwankungen, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Ausgangswert. Sie stimmen mit denen von H o l z e r ¹²⁾ (DPN-Gehalt in ruhender Hefe ca. 350 μ /g), B r i t t o n C h a n c e ¹³⁾ (DPN plus TPN 300 μ /g) und E u l e r ¹⁴⁾ (DPN-Werte von 250 μ /g) angegebenen gut überein. Während der reinen Wachstumsphase kommt es zu einer erheblichen Neusynthese, die beim oxydierten Anteil stärker sein kann als beim reduzierten. Die Synthese geht auch während der Sprossung weiter, ist aber absolut und prozentual nicht mehr so stark wie in den ersten 30 Minuten.

Bei den Triphosphopyridinnukleotiden fanden wir Durchschnittswerte von 18 μ /g Hefe, die für den oxydierten und reduzierten Anteil gleich hoch waren. Diese Werte liegen etwas höher als

die von H o l z e r ¹²⁾ angegebenen. Wir führen dies auf die von uns ausgeführte alkoholische Extraktion zurück, die auch an anderen Organen, z.B. an der Leber, höhere Werte als die wäßrige Extraktion ergibt. Die Triphosphopyridinnukleotide nehmen während der ersten 30 Minuten kaum zu, erst mit der Sprossung setzt eine deutliche Steigerung ein, die nach zwei Stunden das etwa 2,5-fache erreicht hat.

Wird Wachstum und Sprossung durch Fehlen einer N-Quelle im Nährmedium weitgehend gehemmt, was in unseren Versuchen vor allem in den ersten 60 Minuten der Fall war, so findet sich in dieser Zeit nur bei DPN-H eine deutliche Neubildung. Nach zwei Stunden findet sich eine leichte Abnahme, während sich bei DPN eine entsprechende Zunahme findet. Diese Verschiebung ist wohl auf eine Veränderung des Stoffwechsels zurückzuführen, da bekannt ist, daß die Hefegärung nach einem Maximum wieder zurückgeht. Demgegenüber zeigen die Triphosphopyridinnukleotide während der gesamten Versuchszeit einen anderen Gang insofern, als nur die oxydierte Stufe sich etwa auf das Doppelte vermehrt.

Fehlen dagegen die Wuchsstoffe bei vorhandener N-Quelle, so ist bei gehemmter Sprossung ein deutliches Wachstum vorhanden. Bei dieser Version fällt auf, daß neben der Neubildung von Diphosphopyridinnukleotiden auch eine solche von Triphosphopyridinnukleotiden stattfindet, wenn auch in geringerem Umfang als bei der Kontrolle.

Andere Verhältnisse ergaben sich bei der Eigenhemmung der Sprossung und Vermehrung durch hohe Ausgangszellzahlen. Eine völlige Sistierung der Vermehrung während 60 Minuten ergab sich bei einer 5%igen Suspension bei erhaltenem Zellwachstum. Während dieser Periode war weder bei DPN noch bei TPN eine Vermehrung zu beobachten. Dagegen ergab sich innerhalb beider Gruppen eine Verschiebung zugunsten der reduzierten Stufe. Dies ist verständlich, da nach früheren Versuchen bei sehr dichten Hefezellzahlen die Zellen fast nur noch gären. Auch nach Beginn einer geringfügigen und verspäteten Sprossung ändert sich an den Phosphopyridinnukleotiden gegenüber der ersten Stunde nichts.

Aus diesen drei Variationen der Sprossungshemmer ergibt sich, daß bei keinem Phosphopyridinnukleotid eine klare Beziehung zum Ausmaß der Sprossungshemmung besteht. Es ergeben sich immerhin Andeutungen, daß die Neubildung der Triphosphopyridinnukleotide stärker gehemmt ist als die der Diphosphopyridinnukleotide. Es ist allerdings fraglich, ob eine strenge Beziehung zur Sprossung zu erwarten ist, da aus vielen Untersuchungen hervorgeht, daß dieser Vorgang nicht gekoppelt ist mit der Neubildung von Ribonukleinsäuren, bei denen eine besonders enge Beziehung zu Menge und Redoxzustand der Triphosphopyridinnukleotide besteht.

Dasselbe geht auch aus der Glykolysehemmung durch NaF hervor. Hier kommt es nach Einsetzen einer zahlenmäßig gehemmten Sprossung sogar zu einem Abfall der gesamten Diphosphopyridinnukleotide, während bei den Triphosphopyridinnukleotiden sich keine deutlichen Veränderungen abzeichnen.

Aufschlußreich sind ferner die Versuche mit Urethan. In den geprüften Konzentrationen von 2 - 6% war die Sprossung über die ganze Versuchszeit von zwei Stunden stillgelegt. Trotzdem fand sich bei 2% Urethan eine beinahe unveränderte Neubildung aller Phosphopyridinnukleotide. Die Verschiebung des Redoxquotienten bei DPN dürfte auf die Glykolysesteigerung bei dieser Urethankonzentration zurückzuführen sein. Selbst die dreifach höhere Konzentration führt in den ersten 60 Minuten noch zu einer Neubildung von beiden DPN-Anteilen, allerdings mit späterem Abfall.

Auch bei Phenol ist trotz völliger Hemmung der Sprossung eine nur wenig gehemmte DPN-Synthese vorhanden, die allerdings wie bei den höheren Urethanwerten später zurückgeht. Demgegenüber ist die TPN-Synthese wesentlich stärker gehemmt. Es muß offen bleiben, ob zwischen dem differenten Verhalten der beiden Pyridinnukleotidgruppen Beziehungen bestehen derart, daß die verwendeten Phenolkonzentrationen zwar die DNS-Synthese völlig, die RNS-Synthese dagegen nur wenig hemmen.

Insgesamt zeigt sich aus den in der Arbeit gewonnenen Ergebnissen, daß sich die Phosphopyridinnukleotide, insbesondere die DPN-Anteile, je nach Art der Hemmwirkung auf die Sprossung different verhalten. Dies dürfte mit der verschiedenartigen Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch die verwendeten Agentien zusammenhängen. Die Beziehungen der Triphosphopyridinnukleotide zur Hefesprossung sind etwas einheitlicher. Mit Ausnahme von Urethan war bei allen Agentien, die die Sprossung hemmten, auch die Neubildung von TPN völlig oder beinahe völlig gehemmt. Es wäre allerdings noch zu untersuchen, ob es sich dabei um solche Konzentrationen handelt, die in die Neubildung von Zellbestandteilen, insbesondere von Ribonukleinsäure eingreifen. Auf der anderen Seite zeigen eine Reihe von Versuchen, daß ein Zellwachstum auch möglich ist, wenn keine Neubildung von Phosphopyridinnukleotiden erkennbar ist. Es muß allerdings offen bleiben, ob in diesen Fällen eine Zellvergrößerung auf einer Neusynthese aller Zellbestandteile beruht.

Zusammenfassung

- 1.) Durch fraktionierte Zentrifugation wurden Hefezellen gleichmäßiger Größe gewonnen, die im Vermehrungsversuch ein synchronisiertes Verhalten zeigten.
- 2.) An solchen Zellen wurden die Konzentrationen der Phosphopyridinnukleotide und ihre Veränderung während der Vermehrung und unter der Einwirkung von vermehrungshemmenden Agentien untersucht. Die von uns verwendete Bäckerhefe enthält pro Gramm 302 μ DPN, 292 μ DPN-H, 16 μ TPN und 19 μ TPN-H.
- 3.) Diese Werte steigen innerhalb einer Stunde auf das Doppelte an, in der zweiten Stunde geht die Neubildungsrate bei NAD (DPN) zurück, während sie bei NADP (TPN) gleichbleibt.
- 4.) Bei Hemmung der Vermehrung wird in erster Linie die Neubildung der Triphosphopyridinnukleotide herabgesetzt, die Diphosphopyridinnukleotide verhalten sich differenter, und zwar in Abhängigkeit von der Wirkung des jeweiligen Agens auf den Stoffwechsel.

Tabelle 1

Einfluß unterschiedlicher Frierzeiten auf die
Extraktierbarkeit

Frierz.	5 Min.	30 Min.	4 Stunden	15 Stunden
TPN	10,12	10,12	10,12	15,75
DPN	365,8	348,61	338,79	375,62

Tabelle 2

Nachextraktionen

	1.Extraktion	2.Extraktion	1.Extraktion	2.Extraktion
DPN-H	204	-	164,8	-
TPN-H	30	-	15	-
TPN	8,99	-	9,55	-
DPN	157,61	88,38	163,99	77,09

Tabelle 3

Extraktionen aus der gleichen Hefe

Versuchs- Nr.	1	2	3	4	5	6	Mittel= wert	σ	σ^m
DPN-H	235,2	273,6	269,6	188	180	226	228,8	$\sqrt{292}$	17,1
TPN-H	34,5	22,5	37,5	22,5	18,0	39	29,0	$\sqrt{7,4}$	2,72
TPN	15,6	11,2	25,6	25,6	16,7	16,1	19,6	$\sqrt{5,9}$	2,429
DPN	206,2	175,3	205,2	188,1	196,4	193,5	194	$\sqrt{7,4}$	2,72

Tabelle 4

Cellescope - Werte (Zellzahlen $\times 10^3$)

Cellescope-Einstellung	0 Min.	Größen= verteilung	60 Min.	Größen= verteilung	120 Min.	Größen= verteilung
20	127	3	133	8	133	1
30	124	18	125	14	132	14
50	106	39	111	26	118	17
70	67	51	85	58	101	56
110	16	16	27	27	45	45

Cellescope-Einstellung 50 = 5,25 μ

Diskriminator-Einstellung: 30

Tabelle 5

Durchschnittswerte aus 13 Versuchen

	0 Min.		60 Min.		120 Min.	
	Mittelwert	σ^m	Mittelwert	σ^m	Mittelwert	σ^m
DPN-H μ /g	292	8,47	512	26,82	630	15,07
DPN μ /g	302	15,84	532	30,65	648	31,70
$Q \frac{DPN}{DPN-H}$	1		1		1	
ΣDPN	594		1044		1278	
TPN-H μ /g	19	3	36	2,65	46	4,8
TPN μ /g	16	3	31	3,32	51	6,68
$Q \frac{TPN}{TPN-H}$	0,9		0,9		1,1	
ΣTPN	35		67		97	
Sprossung %	10		45		56	
Zellzahl	117000		117000		122000	

Tabelle 6

NaF - Zusatz (n = 2)

	Kontrolle			NaF	
	0'	60'	120'	60'	120'
Sprossung %	11,0	47,0	59,0	11,0	47,0
Wachstum				++	
TPN-H	19,5	33,0	69,0	30,8	21,0
TPN	15,7	30,9	48,9	19,1	15,6
TPN/TPN-H	0,8	0,9	0,7	0,6	0,7
Σ TPN	35,2	63,9	117,9	49,9	36,6
DPN-H	135,6	237,6	595,2	126,8	49,6
DPN	304,4	540,1	712,0	298,5	201,3
DPN/DPN-H	2,2	2,2	1,1	2,3	4,0
Σ DPN	440,0	777,7	1307,2	425,3	250,9

Wachstum ohne Sprossung: + bis +++

Tabelle 7

Äthanol - Zusatz (n = 1)

	Kontrolle			2% Äthanol		4% Äthanol	
	0'	60'	120'	60'	120'	60'	120'
Sprossung %	10	49	50	27	66	15	44
Wachstum						++	
TPN-H	31,5	43,5	82,3	46,5	43,5	33	42
TPN	20,2	34,8	52,3	33,1	24,2	21,4	21,4
TPN/TPN-H	0,6	0,8	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5
Σ TPN	51,7	78,3	134,6	79,6	67,7	54,4	63,4
DPN-H	306,4	540,8	675,2	441,6	588,8	337,2	448
DPN	299,5	554,8	765,9	599	736,5	383,9	457,6
DPN/DPN-H	1,0	1,0	1,1	1,3	1,2	1,1	1,0
Σ DPN	605,9	1095,6	1441,1	11040,6	1325,3	721,1	905,6

Wachstum ohne Sprossung: + bis +++

Tabelle 8

		Urethan - Zusatz (n = 1)											
		Kontrolle		2% Urethan		4% Urethan		6% Urethan					
		60'	120'	60'	120'	60'	120'	60'	120'				
Sprossung %	0'	10	51	58	17	13	12	12	12	10	10	120'	10
Wachstum						+							
TPN-H	19		39,4	71,3	42,0	69	22,1	31,2	22,5	22,5		22,5	
TPN	12,7		33,2	50,2	23,6	46,1	17,9	10,1	5,1	10,7		10,7	
TPN/TPN-H	0,7		0,8	0,7	0,6	0,7	0,8	0,3	0,2	0,5		0,5	
ΣTPN	31,7		72,6	121,5	65,6	115,1	40,0	41,3	27,6	33,2		33,2	
DPN-H	210		410	617	352	752	337,6	428,8	354,4	224		224	
DPN	229		399	585	338,8	402,6	295,6	289,7	360,9	246,5		246,5	
DPN/DPN-H	1,0		0,9	0,9	0,9	0,5	0,9	0,7	1,0	1,1		1,1	
ΣDPN	439		809	1203	690,8	1154,6	633,2	718,5	715,3	470,5		470,5	

Wachstum ohne Sprossung: + bis +++

Tabelle 9

Phenol - Zusatz (n = 5)

	Kontrolle			Phenol	
	0'	60'	120'	60'	120'
Sprossung	10	45	70	10	12
Wachstum				+	+
TPN-H	28,2	63	70,8	33	35,7
TPN	18	60,1	38,2	36	19,6
TPN/TPN-H	0,6	0,9	0,5	1,0	0,5
Σ TPN	46,2	123,1	109	69	55,3
DPN-H	257	634,4	644,3	547,2	490,4
DPN	236,2	486,1	492,6	416	266,6
DPN/DPN-H	0,9	0,8	0,8	0,8	0,5
Σ DPN	493,2	1120,5	1136,9	963,2	757,0

Wachstum ohne Sprossung: + bis +++

Literaturverzeichnis

- 1) Hofmann, E., Moskau H. und Peschke, R.: Biochem. Z. 332, 263 (1960)
- 2) Hofmann, E. und Peschke, R.: Acta biol. med. german. 6, 453 (1961)
- 3) Klingenberg in H. U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse" S. 531 u. 537
- 4) Jacobi: Diss. Marburg 1966
- 5) Williamson, D. H. and Scopes, A. W.: Experimental Cell Research 20, 338 (1960)
- 6) Arnold: Diss. Marburg 1963
- 7) Holzer, H., Busch, D. und Kröger, H.: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 313, 184 (1958)
- 8) Schmid, W.: Zeitschr. f. Naturforschung 7b, 217 (1952)
- 9) Holzer, H. und Witt, J.: Biochem. Zschr. 330, 554 (1958)
- 10) Holzer, H. und Witt, J.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 38, 163 (1960)
- 11) Leuthardt, S. 290
- 12) Holzer, Goldschmidt, Lamprecht und Helmreich: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chemie 297, 1 (1954)
- 13) Britton Chance, Nature (London) 169, 219 (1950)
- 14) Euler, H. v. und Schlenk, F.: Fortschr. chem. org. Naturstoffe 1, 99 (1938)

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Schmid herzlich für seinen Rat und seine Unterstützung danken.

Herrn Doz. Dr. Kunz danke ich für die Übernahme des Correferates.

Lebenslauf

Ich wurde am 15.6.1939 als Tochter des Arbeiters Simon Rosenberger und dessen Ehefrau Armgard, geb. Schmidt, in Ranis/Thür. geboren. Von 1945 bis 1953 besuchte ich die Grundschule in Ziegenrück/Thür. und anschließend die Oberschule in Schleiz/Thür. Dort bestand ich 1957 das Abitur. Danach siedelte ich nach Waldbröl/Rhld. um und legte 1958 die Ergänzungsprüfung zum Abitur ab. Zum SS 1958 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg. Nach dem WS 1958/59 bestand ich das Vorphysikum und nach dem SS 1960 das Physikum. Nach dem ersten klinischen Semester in Marburg belegte ich die beiden folgenden an den Universitäten Berlin und Wien. Ich kehrte zum SS 1962 wieder nach Marburg zurück und studierte hier bis zum Staatsexamen nach dem SS 1963. Danach habe ich einen Teil der Medizinalassistentenzeit abgeleistet. Im Juli 1965 begann ich mit der vorliegenden Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

- in Marburg: Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Exner, Förster, Gedigk, Groß, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrand, Hornung, Jacob, Lang, Linneweh, Mahr, v.Manger-König, Maurath, H.A.Müller, Niessing, Nieth, Oehme, Oksche, Petry, Pirson, Prinz, Roger, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Walcher, Wendt, Würterle;
- in Berlin: Gansau, Just, v.Kress, Linder, Loeschke, v.Mikulich-Radecki, Oeser, Schütz;
- in Wien: Antoine, Böck, Fellingner, Holub, Kraupp, Moritsch, Novotny, Obiditsch-Mayer.

